



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Trabalho de Conclusão de Curso



**Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e
identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia***

Sandra Holanda Sá de Miranda

João Pessoa – Paraíba

2014

Sandra Holanda Sá de Miranda

**Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e
identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia***

Trabalho, apresentado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Paraíba, como requisito para Conclusão de Curso.

DR. MARCELO SOBRAL DA SILVA
ORIENTADOR

João Pessoa – Paraíba

M672d Miranda, Sandra Holanda Sá de.

Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia* / Sandra Holanda Sá de Miranda. - - João Pessoa: [s.n.], 2014.

44f. : il. -

Orientador: Marcelo Sobral da Silva.
Monografia (graduação) – UFPB/CCS.

Sandra Holanda Sá de Miranda

**Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica
e identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia***

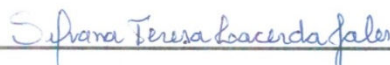
Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao curso de Farmácia do
Centro de Ciências da Saúde,
Departamento de Ciências
Farmacêuticas, da Universidade
Federal da Paraíba como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia sob orientação
do Prof. Marcelo Sobral da Silva.

Aprovado em 23 / 03 / 2024



Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

Orientador (Universidade Federal da Paraíba)



Profa. Mcs. Silvana Jales

Examinadora (Universidade Federal da Paraíba)



Msc. Yanna Carolina Ferreira Teles

Examinadora (Universidade Federal da Paraíba)

RESUMO

A *Melaleuca alternifolia* pertence à família *Myrtaceae*, subfamília *Leptospermoideae*, que ocorre principalmente na Austrália, é comumente conhecida como “tea tree”. A maior parte dos estudos com o óleo da *M. alternifolia* estão relacionados com sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena. O conhecimento dos constituintes químicos das plantas é importante para descoberta do real valor dos fitoterápicos de uso popular, assim como também para testar sua toxicidade. São de grande valor o aperfeiçoamento e descobertas de metodologias que contribuam com aspectos de controle de qualidade dos óleos essenciais. Neste trabalho utilizou-se o método de extração líquido-líquido, também conhecido como extração por solvente ou partição, em solução hexânica. A detecção de substâncias no óleo essencial da *M. alternifolia* (FERQUIMA) foi realizada através da técnica de cromatografia gasosa (CG). Comparando com a ficha técnica da empresa FERQUIMA, e com a norma internacional ISO 4730, os principais compostos mantiveram suas concentrações bem próximas das estipuladas em relação às concentrações encontradas neste trabalho.

Palavras chaves: *Melaleuca alternifolia*, cromatografia gasosa, extração líquido-líquido.

Sumário

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	4
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	7
1.3 ÓLEO DE MELALEUCA	9
1.3.1 CARACTERÍSTICAS	9
1.3.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	10
1.3.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	12
1.4 CONTROLE DE QUALIDADE	13
1.5 VALIDAÇÃO.....	16
1. Especificidade e Seletividade.....	16
2. Linearidade	17
3. Intervalo	18
4. Precisão	19
5. Limite de Detecção	20
6. Limite de Quantificação.....	20
7. Exatidão	21
8. Robustez	22
1.6 CROMATOGRAFIA GASOSA	23
1.7 MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	25
2. ARTIGO	27
2.1 RESUMO	28
2.2 INTRODUÇÃO	30
2.3 METODOLOGIA.....	32
2.3.1 Aquisição da matéria-prima	32
2.3.2 Extração líquido-líquido	32
2.3.3 Análise Cromatográfica	32
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
2.6 AGRADECIMENTOS.....	37
ANEXOS	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Lista de Figuras

Figura 1: Cromatograma de Íons Totais da concentração 2×10^{-22} $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial da <i>Melaleuca alternifolia</i>	33
Figura 2: Cromatograma de Íons Totais da concentração 2×10^{-16} $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial da <i>Melaleuca alternifolia</i>	34
Figura 3: Cromatograma de Íons Totais da concentração 0,5 $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial da <i>Melaleuca alternifolia</i>	34
Figura 4: Cromatograma de Íons Totais da concentração 0,5 $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial da <i>Melaleuca alternifolia</i>	35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Perfil cromatográfico de Tea Tree Oil de acordo com a ISO/FDIS 4730:2004.....	11
Tabela 2: Classificação dos testes, segundo sua finalidade	15
Tabela 3: Ensaaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	15
Tabela 4: Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.	18
Tabela 5: Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico..	23
Tabela 6: Identificação dos Compostos da M. alternifolia através de cromatografia gasosa com detector de massas comparada com o Banco de Dados NIST 2008	35

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças humanas tem suas origens em tempos pré-históricos. As plantas medicinais são utilizadas por 80% da população mundial como único recurso medicamentoso disponível, especialmente nos países em desenvolvimento. Estas plantas e produtos derivados desempenham um papel importante nos cuidados primários de saúde (EL-KAMALI et al, 2010).

Historicamente, as plantas medicinais são importantes como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, estando no reino vegetal a maior contribuição de medicamentos. O termo fitoterapia foi dado à terapêutica que utiliza os medicamentos cujos constituintes ativos são plantas ou derivados vegetais, e que tem a sua origem no conhecimento e no uso popular. As plantas utilizadas para esse fim são tradicionalmente denominadas medicinais. A terapia com medicamentos de espécies vegetais é relatada em sistemas de medicinas milenares em todo o mundo, por exemplo, na medicina chinesa, tibetana ou indiana-ayurvédica.

Na história do Brasil, existem registros de que os primeiros médicos portugueses que para cá vieram, e com a escassez na colônia de remédios empregados na Europa, logo cedo foram obrigados a notar a importância dos remédios de origem vegetal utilizados aqui pelos povos indígenas. Estes viajantes sempre se abasteciam de remédios antes de viajarem por regiões pouco conhecidas. As grandes navegações trouxeram a descoberta de novos continentes, levando ao mundo moderno um grande arsenal terapêutico de origem vegetal até hoje indispensável à medicina. (Ministério da Saúde, 2012).

Atualmente as plantas medicinais, na indústria farmacêutica, são empregadas como matéria-prima para a extração de princípios ativos ou precursores e, principalmente, para a produção de tinturas, xaropes, chás, extratos fluidos, secos, entre outras preparações. Elas são muito cogitadas por profissionais da saúde e por órgãos governamentais como um recurso terapêutico. A padronização de extratos de plantas medicinais visa o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade

para a matéria prima vegetal (incluindo extratos vegetais e fito-constituintes) e para o produto final (forma farmacêutica) com rigoroso controle de todas as etapas envolvidas no processamento (SOUZA, 2007).

No Brasil há ações alternativas, como por exemplo, a denominada de Práticas Integrativas e Complementares, que se enquadra no que a Organização Mundial de Saúde (OMS) denomina de medicina tradicional e medicina complementar e alternativa (MT/MCA) e, sobre esse tema, a OMS recomenda aos seus Estados membros a elaboração de políticas nacionais voltadas à integração/inserção da MT/MCA aos sistemas oficiais de saúde, com foco na Atenção Primária à Saúde (APS).

Dessa maneira no Brasil, de acordo com as recomendações da OMS, foi aprovada, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), que contemplam diretrizes e responsabilidades institucionais para implantação/adequação de ações e serviços de medicina tradicional chinesa/acupuntura, homeopatia, plantas medicinais e fitoterapia, além de instituir observatórios em saúde para o termalismo social/crenoterapia e para a medicina antroposófica no SUS.

“A aprovação da PNPIC desencadeou o desenvolvimento de políticas, programas e projetos em todas as instâncias governamentais, pela institucionalização dessas práticas no SUS. Na instância federal, destaca-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada também em 2006 por decreto presidencial, com diretrizes e ações para toda a cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos.”

“As plantas medicinais e seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos da MT/ MCA e vêm, há muito, sendo utilizados pela população brasileira nos seus cuidados com a saúde, seja na Medicina Tradicional/Popular ou nos programas públicos de fitoterapia no SUS, alguns com mais de 20 anos de existência. Entre as Práticas Integrativas e Complementares no SUS, as plantas medicinais e a fitoterapia são as mais presentes no Sistema, segundo diagnóstico do Ministério da Saúde, e a maioria das experiências ocorrem na APS.”

Todas as ações para implementação das diretrizes dessas políticas nacionais tem por objetivo ampliar a oferta de produtos e serviços relacionados com a fitoterapia

no SUS, de maneira racional e segura e, por profissionais de saúde qualificados, considerando o usuário em sua singularidade e inserção sociocultural, promovendo a integralidade da atenção. (Ministério da Saúde, 2012).

Assim como as demais políticas públicas, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) vem conformar decisões de caráter geral que indicam rumos e linhas estratégicas para atuação governamental, para evitar efeitos de descontinuidade administrativa e potencializar recursos disponíveis ao tornarem públicas, expressas e acessíveis à população, as estratégias do Governo no planejamento de programas, projetos e atividades.

As ações resultantes dessa Política, manifestadas em um Programa, são fundamentais para o aumento e melhoria do acesso da população a plantas medicinais e fitoterápicos, ao desenvolvimento industrial e tecnológico, à promoção da segurança alimentar e nutricional, à inclusão social e regional, além do uso sustentável da biodiversidade brasileira e da preservação e valorização do conhecimento popular associado das comunidades e povos tradicionais.

“Nesse sentido, o governo federal instituiu o Grupo de Trabalho Interministerial para elaboração do **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** (PNPMF) que, em conformidade com as diretrizes e linhas prioritárias da Política Nacional, estabelece ações pelos diversos parceiros, em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso País, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde.”

O procedimento de elaboração do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos teve sua base na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como princípios norteadores: ampliação das opções terapêuticas e aprimoramento da atenção à saúde aos usuários do SUS; Uso sustentável da biodiversidade brasileira; Valorização e preservação do conhecimento popular das comunidades e povos tradicionais; Fortalecimento da agricultura familiar; Desenvolvimento tecnológico e industrial; Inclusão social e redução das desigualdades sociais e; Participação popular e controle social. (Ministério da Saúde, 2009).

A seleção de uma planta para estudo farmacológico é um passo muito importante. A escolha pode ser feita de várias maneiras: através do uso tradicional, dos metabólitos encontrados (componentes químicos), da seleção randomizada ou da combinação de mais de um critério. A estratégia mais comum é o uso das fontes naturais baseado na medicina popular, que é conhecida como etnofarmacologia (RATES, 2001; CARLINI, 2003; ALBUQUERQUE, HANAZAKI, 2006). O uso popular e mesmo tradicional não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (SIMÕES et al., 2001). Diante disso, durante a produção de extratos a partir de matéria prima vegetal, pode-se considerar a padronização como uma condição em que a eficácia do produto é garantida através da constância no teor de princípios ativos.

1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

O termo óleo essencial é utilizado para designar os líquidos oleosos voláteis dotados de forte aroma, extraídos principalmente de plantas, geralmente, por arraste a vapor, podendo também ser empregados na extração outros processos físicos. A International Standard Organization (ISO) define os óleos voláteis como produtos obtidos de partes das plantas através da destilação por arraste a vapor d'água, e também como os produtos obtidos pela expressão de pericarpos de frutos cítricos. Os constituintes químicos mais comuns nos óleos essenciais são misturas de terpenos, geralmente monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides que podem apresentar uma variedade de funcionalizações e, devido às diferentes funcionalizações podem ser utilizados como intermediários de reações de síntese orgânica (VICTORIA, 2010).

Óleos essenciais representam uma pequena fração na composição das plantas, pois conferem características únicas, como aromaticidade, característica essa que poderá classificar plantas em aromáticas ou não-aromáticas, sendo as primeiras largamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de fragrâncias. Apresentam composição complexa, podendo conter diversos componentes, especialmente hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos, dentre outros). Ambos os componentes hidrocarbonetos e oxigenados são responsáveis pelos sabores e odores característicos (POURMORTAZAVI et al., 2007).

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, na produção de antissépticos tópicos. Métodos de investigação *in vitro* têm sido desenvolvidos para que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Entretanto, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos essenciais apresentam, quais sejam: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados (NASCIMENTO, et al., 2007).

O extrato bruto obtido de plantas frescas ou secas, ou partes de plantas (flores, folhas, frutos, raízes e outros) por diferentes processos de extração é ponto de partida para a descoberta e o isolamento de substâncias bioativas. Técnicas convencionais de extração como percolação, maceração e extração por Soxhlet fundamentam-se na escolha correta do solvente extrator, na agitação e no uso de calor, aumentando assim, a solubilidade dos componentes e a taxa de transferência de massa. Entretanto, tais técnicas necessitam de períodos longos de extração e, em alguns casos, o uso de aquecimento, como na extração por Soxhlet, pode ocasionar degradação de substâncias naturais termicamente instáveis presentes no material vegetal (JIANYONG et al, 2001; VINATORU, 2001; SCHINOR et al, 2004; MELECCHI et al, 2006).

Os óleos essenciais são obtidos a partir de diversas partes das plantas, como flores (rosa e jasmim); folhas (eucalipto); raízes (vetiver); casca de frutos (laranja); entre outros. Eles contêm uma mistura de compostos químicos que produzem odor e sabor (PEREIRA, 2010). Assim, o óleo essencial torna-se um artigo muito valorizado e procurado em diversas áreas da indústria, sendo à base da perfumaria desde os tempos antigos até os dias atuais (WOLFFENBÜTTEL, 2007). Além da perfumaria, é observado o crescente interesse pelos óleos essenciais em outros segmentos industriais como o de embalagens, tintas e farmacêutico (BAKKALI et al., 2008; KAMEL et al., 2007; MABBERLEY et al, 1997). Os óleos essenciais e os extratos das plantas possuem um interesse crescente para a indústria e para a pesquisa científica devido às atividades antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiviral e antiparasitária, o que os torna úteis como um aditivo natural para as indústrias de alimentos, de fármacos e de cosméticos.

1.3 ÓLEO DE MELALEUCA

1.3.1 CARACTERÍSTICAS

A melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) pertence à família *Myrtaceae*, subfamília *Leptospermoideae*, que ocorre principalmente na Austrália, Malásia e Polinésia. O gênero *Melaleuca* inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico (CRONQUIST, 1981). A *Melaleuca alternifolia* é comumente conhecida como “tea tree”, florescendo na Austrália, principalmente em áreas de pântano, próximas de rios (RUSSEL et al, 2002).

A árvore de *Melaleuca alternifolia* possui de 5 a 7 metros de altura, cresce em áreas pantanosas e próximas de cursos de água da região costeira subtropical de New South Wales na Austrália, tendo melhor crescimento em áreas de alta pluviosidade, ou áreas com irrigação. A primeira colheita é realizada no período de 1 a 3 anos, dependendo do clima e do crescimento (BURFIELD & SHEPPARDHANGER, 2000).

O aspecto do óleo essencial de *M. alternifolia* apresenta-se com coloração levemente amarelada, transparente, com odor balsâmico, herbal, que lembra pinho fresco. De uma forma geral, é extraído por hidrodestilação, apresentando um rendimento aproximado de 1mL para cada 1000 g de planta (0,1%) (GUEDES, 1997). É recolhido com 50 mL de água, extraído com pentano três vezes, seguido da adição de sulfato de magnésio anidro na fase orgânica (SILVA et al, 2002). Alguns fatores como solo, clima, irrigação, plantação, colheita, idade da árvore, época do ano, influenciam na produção da substância ativa na planta, assim como o modo de extração do princípio ativo das folhas da *M. alternifolia*. Dependendo destas condições têm-se diferentes concentrações dos ativos. O acondicionamento, transporte e armazenamento também são relevantes à qualidade do produto final, pois tem sido sugerido que o armazenamento prolongado provoca o aparecimento de produtos de oxidação que são os principais alérgenos (HAMMER et al, 2006). Um estudo desenvolvido pela RIRDC (Rural Industries Research and Development Corporation) do Governo Australiano determinou os índices de peróxido em 11 amostras comerciais do óleo de Melaleuca correlacionando com seu índice de oxidação, responsável pelos seus efeitos tóxicos, e concluiu que os óleos oxidados são

geralmente associados com altos valores de peróxido e elevados valores de p-cimeno. (SOUTHWELL et al, 2006)

As folhas da *M. alternifolia* têm sido utilizadas popularmente há vários séculos como antisséptico local, para tratar uma variedade de afecções dérmicas como lacerações, queimaduras, mordidas de insetos e micoses. A obtenção do óleo essencial da *M. alternifolia* foi realizada pela primeira vez em 1925, por Arthur Penfold, curador do Museu Australiano de Artes e Ciências Aplicadas, que também avaliou suas propriedades (HAMMER, CARSON; RILEY, 2003). O óleo de *M. alternifolia* é amplamente utilizado pela população, embora os dados disponíveis sobre a segurança e toxicidade do óleo sejam limitados (HAMMER et al, 2005). A maior parte dos estudos com o óleo da *M. alternifolia* estão relacionados com sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena (CALCABRINI et al, 2004).

1.3.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS

O conhecimento dos constituintes químicos é de fundamental importância, não só para descoberta de agentes terapêuticos, mas também porque tais informações podem ser de grande valor econômico na divulgação de novas fontes de substâncias como taninos, alcaloides, óleos, precursores para síntese de substâncias químicas complexas, etc. Além disso, o conhecimento dos constituintes químicos das plantas é valioso para descoberta do real valor dos fitoterápicos de uso popular. (MOJAB et al, 2003)

A composição do óleo da *M. alternifolia* é regulamentada pela norma internacional ISO-4730, que estabelece limites máximos e mínimos para 15 componentes do óleo. Os principais componentes são terpinen-4-ol e 1,8-cineol. O terpinen-4-ol é o marcador da planta, com teor indicado acima de 30%, e o 1,8-cineol não deve exceder 15%, pois este composto não interfere significativamente na ação terapêutica e possui propriedades altamente tóxicas e irritantes. Normalmente os valores encontrados destes dois componentes são de 40% e 3%, respectivamente (International Organisation for Standardisation, 1996; SILVA et al, 2002).

O óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) contém vários mono e sesquiterpenos, bem como compostos aromáticos. Os monoterpenos terpinen-4-ol,

γ -terpineno, α -terpineno, 1,8-cineol, p-cimeno, α -terpineol, α -pineno, terpinoleno, limoneno e sabineno representam 80-90 % do óleo. De cerca de 100 terpenos encontrados em óleo de melaleuca mais de 60 substâncias foram identificadas. O teor natural de terpenos no óleo pode variar consideravelmente, dependendo da população de *Melaleuca alternifolia* utilizada, o clima, a folha, maceração, a idade das folhas e a duração de destilação. Para terpinen-4-ol as concentrações medidas variaram de 28,6% a 57,9%, para γ -terpineno entre 9,5% a 28,3%, para α -terpineno entre 4,6% e 12,8%, para 1,8-cineol de 0,5% a 17,7%, para o p-cimeno a partir de 0,4% a 12,4%, para α -terpineol de 1,5% a 7,6% e para o limoneno a partir de 0,4% a 3,1%. A composição enantiomérica dos componentes principais foi analisada: para terpinen-4-ol a razão enantiomérica era de 65:35 (+ :-).

A fim de regulamentar a qualidade do *Tea Tree Oil*, as exigências foram impostas no Padrão Australiano, na norma internacional ISO 4730 (ISO 4730, 1996 e ISO / FDIS 4730, 2004) e em uma edição anterior da German Drugs Code (DAC) com respeito ao nível de constituintes individuais.

O perfil cromatográfico estabelecido pela ISO / FDIS 4730:2004 é dado na Tabela 1.

Tabela 1: Perfil cromatográfico de Tea Tree Oil de acordo com a ISO/FDIS 4730:2004

Constituintes	Mínimo (%)	Máximo (%)
α -pineno	1	6
Sabineno	traços	3,5
α -terpineno	5	13
Limoneno	0,5	1,5
p-cimeno	0,5	8
1,8-cineol	traços	15
γ -terpineno	10	28
Terpinoleno	1,5	5
Terpinen-4-ol	30	48
α -Terpineol	1,5	8
Aromadendreno	traços	3
Ledene (viridiflorene)	traços	3
δ -cadineno	traços	3
Globulol	traços	3
Viridiflorol	traços	1

A composição do óleo de melaleuca muda particularmente na presença de oxigênio atmosférico, mas também, quando o óleo é exposto a luz e a temperaturas mais elevadas. Os níveis de α -terpineno, γ -terpineno e terpinoleno diminuí enquanto

que o nível de p-cimeno aumenta em até dez vezes. Processos de oxidação conduzem à formação de peróxidos e endoperóxidos e epóxidos. (European Commission, Health & Consumer Protection. 2004.)

1.3.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Atualmente, muitas plantas que estão sendo estudadas são capazes de atuar no comportamento, humor, pensamento e sensações e, o entendimento dos seus mecanismos de ação, segurança e eficácia é um desafio para os pesquisadores na atualidade (CARLINE, 2003; CARLINE, E. A., et al, 2006).

O óleo *Tea Tree* é considerado um remédio universal para a acne, eczema, infecções de pele como herpes, feridas, verrugas, queimaduras, picadas de insetos e micose de unha. Outras indicações mencionadas são resfriados, dor de garganta, infecções de garganta e gengiva, hemorroidas e infecções vaginais. De acordo com uma recente revisão sobre o uso de plantas em cosméticos o óleo *Tea Tree* é amplamente empregado no cuidado com a pele para o tratamento de feridas, bolhas, manchas, erupções cutâneas, verrugas, queimaduras e acne. Sua atividade antimicrobiana é bem conhecida.

O óleo *Tea Tree* não está sujeito a qualquer restrição para o uso em produtos cosméticos. É vendido diluído e altamente concentrado para o público. Além disso, o óleo é utilizado como ingrediente de cosméticos, por exemplo, para pele e produtos de higiene corporal, creme dental, enxaguante bucal e em óleos de banho, bem como em produtos para aromaterapia. A monografia sobre o óleo *Tea Tree* como um ingrediente ativo a ser utilizado em produtos cosméticos foi preparado em 2001 pela delegação norueguesa ao Conselho do Comitê Europeu de especialistas em produtos cosméticos.

A Associação Europeia de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumaria (COLIPA), em 2002 publicou a seguinte recomendação:

"COLIPA recomenda que o óleo *Tea Tree* não deve ser usados em produtos cosméticos, em concentração maior do que 1% de óleo a ser aplicada ao corpo. Ao formular o *Tea Tree* em um produto cosmético, as empresas devem considerar que o potencial de sensibilização aumenta se certos componentes do óleo se tornam oxidados. Para reduzir a formação destes produtos de oxidação, os fabricantes devem

considerar o uso de antioxidantes e/ou embalagens específicas para minimizar a exposição à luz." (European Commission, Health & Consumer Protection. 2004.)

Quando os principais componentes da *M. alternifolia* (terpeno-4-ol, α -terpeno, α -pineno, e cineol) foram testados frente ao *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Propionibacterium acnes* observou-se que todos os componentes, exceto o cineol foram capazes de inibir os microrganismos citados (WENDELL, 2002). É ao 4-terpineol que se acredita ser constituinte ativo do óleo, porém no experimento realizado por RAMAN e colaboradores (1995) relata-se que o α -terpeno e α -pineno também se mostraram ativos e que o *P. acnes* se mostrou mais sensível ao óleo essencial da *M. alternifolia* e seus componentes que o *S. aureus*.

1.4 CONTROLE DE QUALIDADE

A importância do aperfeiçoamento e descobertas de metodologias que visem contribuir com aspectos de controle de qualidade dos óleos essenciais pode ser embasada tanto da ótica acadêmica como comercial. No panorama acadêmico a determinação de especificações de qualidade, baseadas em parâmetros físico-químicos, organolépticos, e no perfil cromatográfico dos óleos essenciais pode auxiliar na detecção e combate a adulterações e desvios de critérios previstos pela legislação. No panorama comercial novas metodologias de validação e quantificação de óleos essenciais podem ser utilizadas como fonte de informação para controle e otimização de processos de produção.

Entretanto, para que possam ser amplamente utilizados, os compostos vegetais devem estar em formas padronizadas, com a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos, fornecendo os requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos em uma preparação farmacêutica moderna o que, de modo geral, não acontece nas indústrias de produção de medicamentos fitoterápicos.

A Resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) RE nº 899, de 29 de maio de 2003, determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos".

No que se referem aos métodos analíticos as informações contidas na RE nº899 apresentam as características a serem consideradas durante a validação de

procedimentos analíticos. E define que o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

Essas informações se aplicam a técnicas analíticas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a métodos não-cromatográficos, desde que estes ofereçam uma seletividade aceitável (por ex. titulometria, espectrofotometria UV-VIS), a testes imunológicos ou microbiológicos, desde que observado o grau de variabilidade usualmente associado a estas técnicas.

“A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise. Devem-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados.” (ANVISA, 2012.)

Considera-se corrida analítica as medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas nas mesmas condições: método, analista, instrumentação, local, condições de utilização e em intervalo de tempo curto entre as medições. No caso de metodologia analítica descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada. No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir, conforme especificado nas Tabelas 2 e 3.

Os testes são classificados em 4 categorias, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Classificação dos testes, segundo sua finalidade

Categoria	Finalidade dos Testes
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: ANVISA, 2012.

Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, relacionados na Tabela 3.

Tabela 3: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II (quantitativo)	Categoria II (ensaio limite)	Categoria III	Categoria IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: ANVISA, 2012.

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão

No caso da transferência de metodologias da matriz para suas subsidiárias no Brasil e/ou das empresas nacionais para os centros de estudos de equivalência farmacêutica, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados

os parâmetros de precisão, especificidade e linearidade. Cópia de toda a documentação original da validação da metodologia deverá ser anexada, como prova de que a metodologia foi originalmente validada e deverá conter, no mínimo, todos os parâmetros relacionados na Tabela 3.

Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

A metodologia analítica deverá ser revalidada nas seguintes circunstâncias: mudanças na síntese da substância ativa; mudanças na composição do produto acabado; mudanças no procedimento analítico.

Determinadas outras mudanças podem requerer validação também, dependendo da natureza das mudanças. (ANVISA, 2012.)

1.5 VALIDAÇÃO

“A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise. Devem-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados.” (ANVISA, 2012.)

Metodologia

1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

1.1. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados

positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes.

1.2. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

1.3 Em métodos cromatográficos deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

2.1. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos da Tabela 4.

2.2. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente

angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática.

2.3. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

2.4. Devem-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático).

3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 4). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

Tabela 4: Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e +20% sobre o maior valor.

4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

4.1. Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

4.2. Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

4.3. Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

5. Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

5.1. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável;

5.2. No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc).

5.3. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação,

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

6. Limite de Quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra.

6.1. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação,

$$LD = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

6.2. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

7.1. Fármaco

7.1.1. aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência);

7.1.2. comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;

7.2. Forma Farmacêutica

7.2.1. na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);

7.2.2. nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

7.3. Impurezas

7.3.1. análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco;

7.3.2. no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado). A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

A Tabela 5 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

Tabela 5: Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.

Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade das soluções analíticas • Tempo de extração
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"> • Variação do pH da solução • Temperatura • Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none"> • Variação do pH da fase móvel • Variação na composição da fase móvel • Diferentes lotes ou fabricantes de colunas • Temperatura • Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none"> • Diferentes lotes ou fabricantes de colunas • Temperatura • Velocidade do gás de arraste

(ANVISA, 2012.)

1.6 CROMATOGRAFIA GASOSA

A detecção ou separação de substâncias que estão em pequenas quantidades em uma mistura, como nos óleos essenciais, atualmente são realizadas por métodos cromatográficos. Devido à alta precisão e confiabilidade dessas técnicas, elas são muito utilizadas para tais fins.

Em diferentes áreas do conhecimento a cromatografia tem sido utilizada. Como as técnicas cromatográficas possuem grande sensibilidade possibilita o seu uso de forma cotidiana em análise de substâncias em baixas concentrações, como no controle do processamento de alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, no caso do doping, na toxicologia entre outras aplicações (NAKASHIMA, 2005; ANVISA, 2012; CHINCHOLE et al., 2012; GILBERT-LÓPEZ et al., 2012; XU et al., 2012).

Pela primeira vez, há pouco mais de 100 anos, a cromatografia foi relatada por Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919). Tswett trabalhou em sua primeira pesquisa, no período de 1899 à 1901, com a estrutura físico-química da clorofila das plantas (ETTRE, 2000). O trabalho de Tswett foi apresentado em forma de tratado para a Sociedade de Ciências de Varsóvia, onde descreveu os resultados preliminares de suas pesquisas com extrato de folhas, utilizando uma coluna de vidro com carbonato de cálcio, separando os constituintes do extrato pela passagem de éter dietílico (COLLINS, 2007).

Durante os cem anos que se seguiram da publicação de Tswett a cromatografia passou por grande evolução. Em decorrência desta técnica se basear em duas fases (móvel e estacionária) e da possibilidade de utilização de diferentes componentes nestas fases, a cromatografia demonstrou sua grande flexibilidade. O controle do fluxo da fase móvel por gravidade, pressão, ação capilar, eletro-osmose, aliado ao fato de o processo poder ser realizado em diferentes temperaturas, permitiu que a técnica de separação pudesse ser aplicada desde pequenas moléculas a grandes quantidades de substâncias (ETTRE, 2000).

Assim, a evolução da técnica iniciou-se na cromatografia líquida de adsorção seguida pela cromatografia de partição. Posteriormente surgiu a análise de gases e amostras vaporizadas, seguida pelas trocas iônicas, separação por tamanho molecular e eletrocromatografia (ETTRE, 2000). E mais recentemente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e utilizada nos laboratórios de análises químicas e farmacêuticas. (MALDANER & JARDIM, 2009).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com alto poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Dependendo da substância a ser analisada e do tipo de detector empregado pode-se detectar cerca de 10-12 g do composto por mL⁻¹, o que permite que pequenas quantidades da amostra sejam analisadas (PERES, 2002).

Esta técnica está baseada na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida ou sólida, que propiciam a separação da mistura por meio de processos físicos e químicos (DEGANI et al., 1998;

PERES, 2002). A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou termicamente estável (PERES, 2002).

Na cromatografia gasosa (CG), a amostra é vaporizada e injetada no topo de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita pela fase móvel, através de fluxo de um gás inerte. No contrário da maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, sendo sua única função o transporte do analito através da coluna (SKOOG et al., 2002).

1.7 MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

É um método para separar um componente ou componentes específicos de uma mistura de líquidos baseado em suas diferentes solubilidades em dois líquidos diferentes imiscíveis, normalmente água e um solvente orgânico. (SANSON et al, 2011)

A extração líquido-líquido é utilizado em diversas áreas como na indústria galvânica que possibilita o recobrimento de superfícies metálicas com metais diversos, permitindo, assim, principalmente um aumento na resistência à corrosão da peça. Desta forma, peças de metais mais baratas tornam-se mais resistentes e adquirem, como consequência, uma melhor aparência, o que aumenta o seu valor agregado. Por outro lado, os processos produtivos associados a essas atividades industriais contemplam diversas etapas de processamento de superfícies metálicas em contato com soluções aquosas (ácidas e básicas) que levam, inevitavelmente, à geração de efluentes líquidos contendo uma grande variedade de metais pesados dissolvidos. (PEREIRA NETO et al, 2008)

Uma área de grande utilidade é a extração de produtos naturais (SANSON et al, 2011; RIBEIRO et al, 2007). Por este processo, um composto solúvel é normalmente separado de um composto insolúvel.

A extração líquido-líquido objetiva a extração de uma substância de uma fase líquida em outra fase líquida. Este tipo de processo é comumente realizado após uma reação química como parte de 5 (rotina de trabalho em laboratório de química visando isolar e purificar o(s) produto(s) de uma reação química). (CORTEZ et al, 2002)

A extração líquido-líquido é bastante utilizada para separar analitos de matrizes complexas como sangue, soro e urina. (QUEIROZ et al, 2001; CATTANEOA et al, 2007.)

Muitos trabalhos têm sido descritos para a pré-concentração de poluentes orgânicos de matrizes aquosas utilizando micro extração líquido-líquido. A micro extração é uma forma de extração líquido-líquido convencional na qual a extração é realizada com razão entre fases superior a 100¹². (CARASEK et al, 2002)

E também a extração líquido-líquido é amplamente utilizada nas análises de resíduos de agrotóxicos em diversas matrizes ambientais (DE PINHO et al, 2010).

2. ARTIGO

Título: Desenvolvimento do método de extração em solução hexânica e identificação dos compostos do óleo de *Melaleuca alternifolia*

Sandra Holanda Sá de Miranda¹; Sócrates Golzio¹; Ana Letícia Braz¹; Juliano Oliveira²; Marcelo Sobral da Silva¹.

1. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Campus I, João Pessoa, Paraíba.

2. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Materiais, Campus I, João Pessoa, Paraíba.

Artigo a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Farmacognosia

2.1 RESUMO

A *Melaleuca alternifolia* pertence à família *Myrtaceae*, subfamília *Leptospermoideae*, que ocorre principalmente na Austrália, é comumente conhecida como “tea tree”. A maior parte dos estudos com o óleo da *M. alternifolia* estão relacionados com sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena. O conhecimento dos constituintes químicos das plantas é importante para descoberta do real valor dos fitoterápicos de uso popular, assim como também para testar sua toxicidade. São de grande valor o aperfeiçoamento e descobertas de metodologias que contribuam com aspectos de controle de qualidade dos óleos essenciais. Neste trabalho utilizou-se o método de extração líquido-líquido, também conhecido como extração por solvente ou partição, em solução hexânica. A detecção de substâncias no óleo essencial da *M. alternifolia* (FERQUIMA) foi realizada através da técnica de cromatografia gasosa (CG). Comparando com a ficha técnica da empresa FERQUIMA, e com a norma internacional ISO 4730, os principais compostos mantiveram suas concentrações bem próximas das estipuladas em relação às concentrações encontradas neste trabalho.

Palavras chaves: *Melaleuca alternifolia*, cromatografia gasosa, extração líquido-líquido.

ABSTRACT

Melaleuca alternifolia belongs to *Myrtaceae* family, subfamily *Leptospermoideae*, which occurs mainly in Australia, being commonly known as "tea tree". Most studies regarding the *M. alternifolia* oil are related to its antimicrobial, antiinflammatory, antiviral and anticancer activities. The knowledge about plant chemical constituents is important to discover the true value of herbal medicines and to evaluate its toxicity. The improvement of methodologies and findings in order to contribute to essential oil quality control has great value. The detection of substances in the *M. alternifolia* essential oil was performed using gas chromatography (GC). Comparing with the concentration data from FERQUIMA company, and with the international standard ISO 4730, the main compounds kept their concentration near the stipulated.

Key words : *Melaleuca alternifolia*, gas chromatography, liquid-liquid extraction.

2.2 INTRODUÇÃO

A *Melaleuca alternifolia* pertence à família *Myrtaceae*, subfamília *Leptospermoideae*, que ocorre principalmente na Austrália, Malásia e Polinésia (CRONQUIST, 1981). A *Melaleuca alternifolia* é comumente conhecida como “tea tree”, florescendo na Austrália, principalmente em áreas de pântano, próximas de rios (RUSSEL et al, 2002).

A maior parte dos estudos com o óleo da *M.alternifolia* estão relacionados com sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena (CALCABRINI et al, 2004).

Alguns fatores como solo, clima, irrigação, plantação, colheita, idade da árvore, época do ano, influenciam na produção da substância ativa na planta, assim como o modo de extração do princípio ativo das folhas da *M. alternifolia*. Dependendo destas condições têm-se diferentes concentrações dos ativos (HAMMER et al, 2006).

O óleo essencial de *M.alternifolia* apresenta-se com coloração levemente amarelada, transparente, com odor balsâmico, herbal, que lembra pinho fresco. De uma forma geral, é extraído por hidrodestilação, apresentando um rendimento aproximado de 1mL para cada 1000 g de planta (0,1%) (GUEDES, 1997).

O conhecimento dos constituintes químicos das plantas é valioso para descoberta do real valor dos fitoterápicos de uso popular (MOJAB et al, 2003), assim como também para testar sua toxicidade.

A composição do óleo da *M.alternifolia* é regulamentada pela norma internacional ISO-4730, que estabelece limites máximos e mínimos para 15 componentes do óleo. Os principais componentes são terpinen-4-ol e 1,8-cineol. O terpinen-4-ol é o marcador da planta, com teor indicado acima de 30%, e o 1,8-cineol não deve exceder 15%, pois este composto não interfere significativamente na ação terapêutica e possui propriedades altamente tóxicas e irritantes. Normalmente os valores encontrados destes dois componentes são de 40% e 3%, respectivamente (International Organisation for Standardisation, 1996; SILVA et al, 2002).

Quando os principais componentes da *M.alternifolia* (terpeno-4-ol, α -terpeno, α -pineno, e cineol) foram testados frente ao *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Propionibacterium acnes* observou-se que todos os componentes,

exceto o cineol foram capazes de inibir os microrganismos citados (WENDELL, 2002). É a 4-terpineol que se acredita ser constituinte ativo do óleo, porém no experimento realizado por RAMAN e colaboradores (1995) relata-se que o α -terpeno e α -pineno também se mostraram ativos e que o *P.acnes* se mostrou mais sensível ao óleo essencial da *M.alternifolia* e seus componentes que o *S.aureus*.

É de grande importância o aperfeiçoamento e descobertas de metodologias que contribuam com aspectos de controle de qualidade dos óleos essenciais. O perfil cromatográfico dos óleos essenciais pode auxiliar na detecção e combate a adulterações e desvios de critérios previstos pela legislação. Novas metodologias de validação e quantificação de óleos essenciais podem ser utilizadas como fonte de informação para controle e otimização de processos de produção. Dessa maneira, para que possam ser amplamente utilizados, os compostos vegetais devem estar em formas padronizadas, com a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos, fornecendo os requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos em uma preparação farmacêutica moderna (ANVISA, 2012).

O método de extração líquido-líquido, também conhecido como extração por solvente ou partição, é um método para separar componentes de uma mistura de líquidos, se baseando nas suas diferentes solubilidades em dois líquidos diferentes e imiscíveis entre si. Este processo de separação objetiva a extração de uma substância numa fase líquida em outra fase líquida (COLINS; BRAGA E BONATO, 2007).

A detecção de substâncias que estão em pequenas quantidades nos óleos essenciais, atualmente é realizada por métodos cromatográficos. Devido à alta precisão e confiabilidade dessas técnicas. Como as técnicas cromatográficas possuem grande sensibilidade possibilita a identificação de substâncias em baixas concentrações (NAKASHIMA, 2005; ANVISA, 2012; CHINCHOLE et al., 2012; GILBERT-LÓPEZ et al., 2012; XU et al., 2012).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com alto poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Dependendo da substância a ser analisada e do tipo de detector empregado pode-se detectar cerca de 10^{-12} g do composto por mL^{-1} , o que permite que pequenas quantidades da amostra sejam analisadas (PERES, 2002).

Neste trabalho o objetivo é desenvolver o método de extração em solução hexânica do óleo de *Melaleuca alternifolia* (Ferquima) assim como também identificar seus constituintes químicos, e comparar com a ficha técnica da empresa Ferquima Indústria de Comércio de Óleos Essenciais (Anexo I), e com a norma internacional ISO 4730.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Aquisição da matéria-prima

O óleo de *Melaleuca alternifolia* foi obtido da empresa FERQUIMA. Todos os padrões e demais reagentes necessários foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

2.3.2 Extração líquido-líquido

Para fazer a extração dos constituintes do óleo utilizou-se Hexano PA, e preparou-se soluções nas concentrações : 2×10^{-2} , 2×10^{-4} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} , 2×10^{-10} , 2×10^{-12} , 2×10^{-14} , 2×10^{-16} , 2×10^{-18} , 2×10^{-20} , 2×10^{-22} μL de óleo/mL. Em um segundo momento outras concentrações foram analisadas também: 1,0 , 0,5 , 0,25 , 0,125 , 0,0625 $\mu\text{L/mL}$. Todas as soluções foram agitadas por agitação mecânica e foram preparadas a temperatura ambiente (25°C) e os experimentos dessa etapa foram conduzidos com o auxílio de um cromatógrafo em fase gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas (CG-EM) (GCMSQP2010-ULTRA, Shimadzu).

2.3.3 Análise Cromatográfica

A identificação dos compostos nos extratos foi realizado em Cromatógrafo a gás acoplado ao detector de massas (GCMS-QP2010 Ultra). Na análise cromatográfica foi utilizada uma coluna capilar Rtx-5MS, com filme de dimetilpolisiloxano (95%) (0,25 μm) com 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno. Foi tilizado split 1:20 como modo de injeção para um volume de injeção de 1,0 μL . Utilizou-se hélio como fase móvel, com fluxo de 1,0 mL/min. As condições cromatográficas de análise simultânea foram: aquecimento do forno/coluna

a 60 °C, rampa de temperatura na faixa de 60 °C a 200 °C com razão de aquecimento de 10 °C/min, logo após uma rampa de temperatura na faixa de 200°C a 280°C com razão de aquecimento de 20°C/min, manter a temperatura do injetor em 260°C e a temperatura do detector permanece em 280°C.

2.4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as soluções de concentrações 2×10^{-2} , 2×10^{-4} , 2×10^{-6} , 2×10^{-8} , 2×10^{-10} , 2×10^{-12} , 2×10^{-14} , 2×10^{-16} , 2×10^{-18} , 2×10^{-20} , 2×10^{-22} µL/mL, durante um tempo de análise de 20 minutos, não foram satisfatórios, pois o tempo não foi suficiente para se identificar os compostos. Não sendo possível observar nitidamente os picos, como mostra a Figura 1.

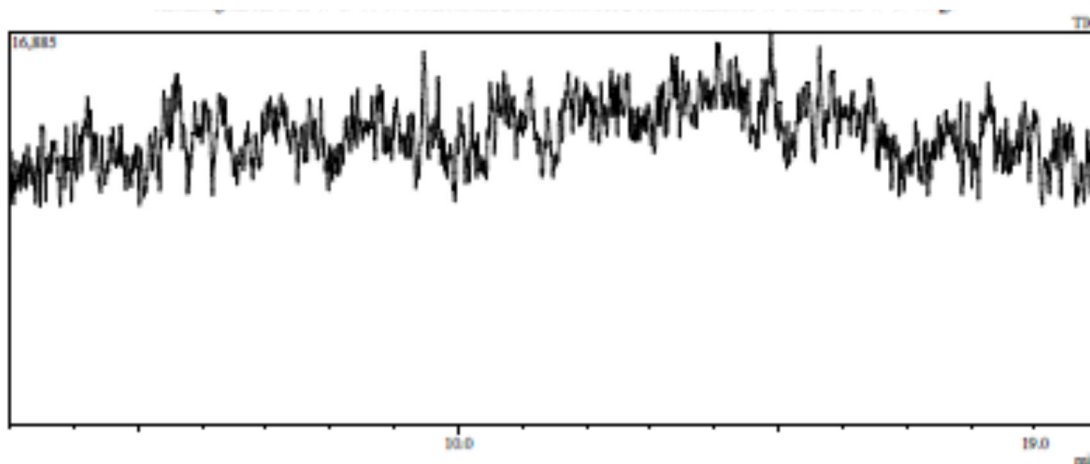


Figura 1: Cromatograma de Íons Totais da concentração 2×10^{-22} µL/mL do óleo essencial da *Melaleuca alternifolia*

Desta maneira, aumentando o tempo de análise para 1 hora, obteve-se o cromatograma a seguir, como mostra a Figura 2, onde as concentrações foram muito baixas e não foi possível detectar os compostos químicos do óleo.

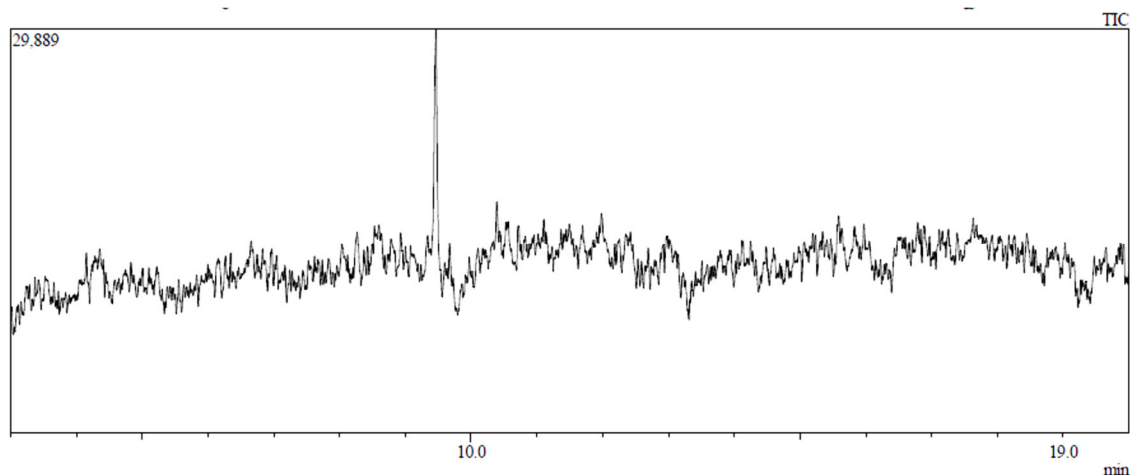


Figura 2: Cromatograma de Íons Totais da concentração 2×10^{-16} µL/mL do óleo essencial da *Melaleuca alternifolia*

Desta forma, posteriormente foram feitas soluções em concentrações mais elevadas (1,0 , 0,5 , 0,25 , 0,125 , 0,0625 µL/mL), levando-as para análise por 1 hora. E obteve-se o cromatograma, como mostra a Figura 3. Neste é possível observar os picos para posterior identificação dos compostos.

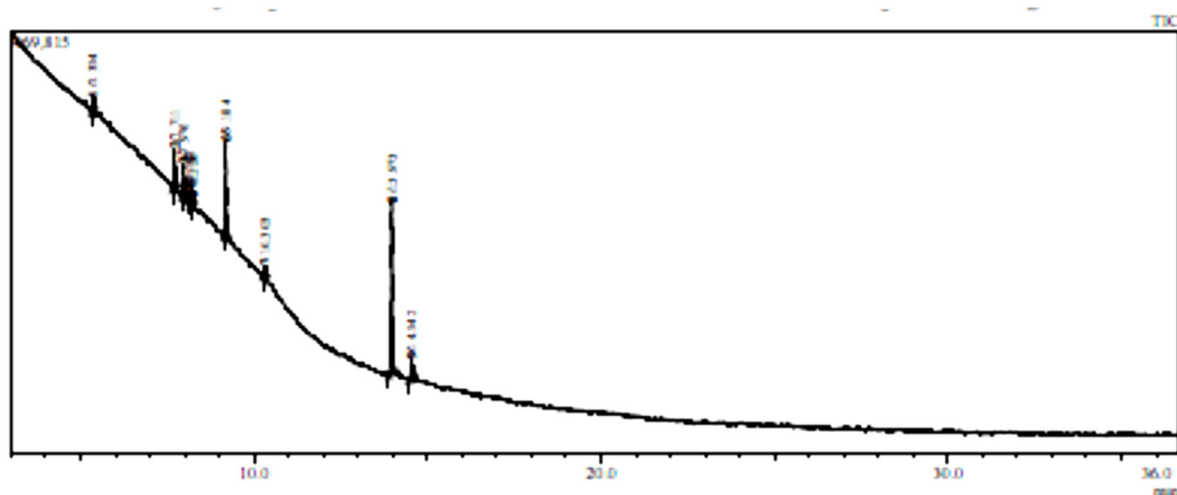


Figura 3: Cromatograma de Íons Totais da concentração 0,5 µL/mL do óleo essencial da *Melaleuca alternifolia*

Em seguida, otimizou o método para análise em 36 minutos, onde se pôde ver e identificar melhor os picos do cromatograma, como mostra a Figura 4.

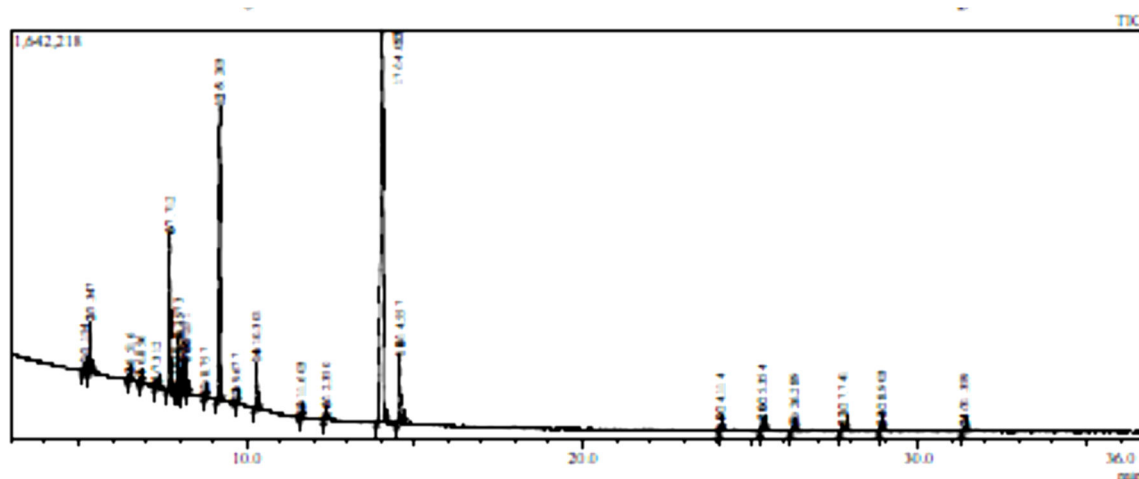


Figura 4: Cromatograma de Íons Totais da concentração 0,5 µL/mL do óleo essencial da *Melaleuca alternifolia*

Assim, identificou os seguintes compostos, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6: Identificação dos Compostos da *M. alternifolia* através de cromatografia gasosa com detector de massas comparada com o Banco de Dados NIST 2008

Ret. Time	Are%	Heght%	A/H	Nome
5.151	0.38	0.74	1.97	.alpha.-Phellandrene
5.346	2.69	5.00	2.04	.alpha.-Pinene
5.574	0.05	0.09	2.00	Hydroperoxide, 1-ethylbutyl
5.830	0.05	0.09	1.92	Hydroperoxide, 1-methylpentyl
6.397	0.07	0.12	2.18	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
6.512	0.32	0.50	2.39	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-
6.684	0.05	0.08	2.39	Cyclohexene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
6.853	0.28	0.47	2.32	.beta.-Myrcene
7.310	0.23	0.29	2.98	.alpha.-Phellandrene
7.711	6.92	10.10	2.60	Terpinene <alpha>
7.875	0.11	0.17	2.40	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
7.981	7.80	11.47	2.58	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-
8.117	1.94	2.62	2.81	D-Limonene
8.210	1.98	2.92	2.57	Eucalyptol

8.759	0.08	0.11	2.81	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-
9.212	18.97	22.43	3.21	.gamma.-Terpinen
9.483	0.08	0.12	2.54	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)-
9.673	0.14	0.19	2.87	2-Furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro-.alpha.,.alpha.,5-trimethyl-, cis-
10.297	2.79	3.54	2.99	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
11.598	0.08	0.10	3.02	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)-
11.700	0.08	0.11	2.90	Cyclooctanone
12.343	0.12	0.14	3.23	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-dimethyl-2-methylene-, [1S-(1.alpha.,3.alpha.,5.alpha.)]-
12.448	0.05	0.07	2.49	Cyclopentanol, 1,2-dimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,2.beta.,3.beta.)]-
14.085	44.87	28.49	5.97	(-)-4-Terpineol
14.326	0.09	0.10	3.39	Benzeneethanol, .alpha.,.alpha.-dimethyl-, acetate
14.568	5.28	5.70	3.51	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl-
17.266	0.38	0.39	3.67	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2-(acetyloxy)-1-[(acetyloxy)methyl]ethyl ester, (Z,Z,Z)-
17.961	0.33	0.32	3.87	Bicyclo[3.1.1]hept-2-en-4-ol, 2,6,6-trimethyl-, acetate
18.745	0.18	0.19	3.61	Bicyclo[3.1.1]hept-2-en-6-ol, 2,7,7-trimethyl-, acetate, [1S-(1.alpha.,5.alpha.,6.beta.)]-
20.208	0.31	0.31	3.77	1,3-Dioxolane, 2,2-dimethyl-4,5-di-1-propenyl-
22.009	0.13	0.12	4.05	5-Isopropyl-6-methyl-hepta-3,5-dien-2-ol
24.111	0.17	0.14	4.40	1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7b.alpha.)]-
24.527	0.20	0.19	3.96	Caryophyllene
25.357	1.02	0.90	4.27	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-
26.286	0.25	0.23	4.07	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1aR-(1a.alpha.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-
26.824	0.08	0.09	3.19	Cadina-1(6),4-diene
27.741	0.47	0.40	4.48	Viridiflorene
28.903	0.43	0.44	3.71	Cadinene <delta>
31.366	0.41	0.35	4.40	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4a.alpha.,7.alpha.,8a.beta.)]-

31.675	0.07	0.09	3.04	1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-
--------	------	------	------	---

Onde observamos que os compostos principais e/ou majoritários são:

Terpinen-4-ol com 44,8%, .gamma.-Terpinen com 18,97% e alpha Terpinene com 6,92%, Cineol/eucalyptol com 1,98%.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a ficha técnica da FERQUIMA (Anexo I), e com a norma internacional ISO 4730, os principais compostos mantiveram suas concentrações bem próximas das estipuladas em relação às concentrações encontradas em nosso trabalho.

2.6 AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e força que me foram concedidas. À minha família pelo amor e apoio. A todos do NUCAL, em especial a Sócrates. Aos amigos por todo carinho e dedicação.

ANEXOS

I.

**FERQUIMA**

LAUDO TÉCNICO
Óleo Essencial de Melaleuca (Tea Tree)
(Melaleuca alternifolia)

Lote: 187	CAS Number: 68647-73-4
Fabricação: Outubro/2012	Validade: Outubro/2014

Ítems Controlados	Resultados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Palha	Incolor a Amarelo Claro
Impurezas	Isento	Isento
Odor	Característico	Característico
Densidade (20°C)	0,895	0,885 – 0,906
Índice de Refração (20°C)	1,477	1,470 – 1,482
Rotação Ótica		[+5° ; +15°]
Data da Análise	06/12/2012	
Resultado	Aprovado	
Origem	Austrália	
Principais Componentes (aprox.)	Terpinen-4-ol = 42% Gamma terpinene = 23% Alpha terpinene = 11% Cineol = 1,7 %	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos. Não ingerir. Evitar contato do produto puro com olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Riscos	Produto inflamável a temperatura acima de 60°C. Perigo de fogo se exposto ao calor ou fonte de ignição. O líquido provoca irritação nos olhos, aparelho respiratório e digestivo. Polui as águas e o solo. O envio ao esgoto é proibido. As águas de combate ao fogo podem causar poluição.
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Número da Onu: 1169 / Classe: 3 / LÍQUIDO INFLAMÁVEL

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aburjai T, Natsheh FM (2003) Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Res* 17: 987-1000

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Resolução RE nº899, 2012.

BAGG, J.; JACKSON, M. S.; SWEENEY, M. P.; RAMAGE, G.; DAVIES, A. N. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeast isolated from the mouths of patients with advanced cancer, *Oral Oncol.*, v42, p487 – 492, 2006.

Brand, C.; Ferrante, A.; Prager R. H.; Riley, T. V.; Carson, C. F.; Finlay-Jones, J. J.; Hart, P. H. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm. res.* 50 (2001) 213–219.

Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR (1989) Gas chromatographic quality control for oil of melaleuca terpinen-4-ol type (Australian tea tree). *J Agric Food Chem* 37: 1330-5

Carson CF, Riley TV (1993) Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Lett Appl Microbiol* 16: 49-55

Carson CF, Riley TV (1994) The antimicrobial activity of the tea tree oil. *Med J Australia* 160: 236

CARSON, C. F.; SMITH, D. W.; LAMPACHER, G. J.; RILEY, T. V. USE OF deception to achieve double-blinding in a clinical trial of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for the treatment of recurrent herpes labial. *Contemporary Clin. Trials*, v29, p. 9 – 12, 2008.

CARASEK, E.; TONJES, J. W.; SCHARF M. Pré-Concentração de Chumbo e Cádmio em um Sistema de Micro Extração Líquido-Líquido. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 5, 748-752, 2002.

CATTANEOA, R. et al. Validação do método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Bras Toxicol*, v. 19, p. 21-7, 2007.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. *Quim. Nova*, vol.31, No. 3, 623 – 636, 2008.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, 2007.

CORTEZ, Daniela Vieira et al . Otimização do processo de extração de β -xilosidase por sistemas micelares reversos. Rev. Bras. Cienc. Farm., São Paulo , v. 38, n. 4, Dec. 2002 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322002000400007&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322002000400007>

DE PINHO, Gevany Paulino et al. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

EL-Kamali, H. H., EL-amir, M. Y. Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of Ethanolic Extracts Obtained from Selected Sudanese Medicinal Plants. Journal of Biological Sciences: 143-146, 2010

EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS(SCCP), Opinion on Tea Tree Oil. 2004.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEU, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Journal of Applied Microbiology, p 853 – 860, 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEU, T. V. Frequencies or resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Agentes*, v.32, p. 170 – 173, 2008.

International Organisation for Standardisation. ISO 4730 (1996) International Standard Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (Tea Tree oil)

International Organisation for Standardisation. ISO/FDIS 4730 (2004) Final draft, International Standard Oil of *Meleleuca*, terpinen-4-ol type (Tea Tree oil)

Johns MR, Johns JE, Rudolph V (1992) Steam distillation of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. J Sci Food Agric 58: 49-53

KREUGER, M. R. O.; TERNES, C. E.; MELLO, L. L.; CRUZ, A. B.; LEITE, S. N.; TAMES, D. R. The influence of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* on the healing of infected dental alveoli: A histological study in rats. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 17(3): 349 – 355, 2007.

Leach DN, Wyllie SG, Hall JG, Kyratzis I (1993) Enantiomeric composition of the principal components of the oil of *Melaleuca alternifolia*. J Agric Food Chem 41: 627-32

Mojab, F., Kamalinejad, M., Ghaderi, N., Vahidipour, H. R. Phytochemical Screening of Some Species of Iranian Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2003. p.77-82)

Osborne F, Chandler F (1998) Australian tea tree oil. *Canadian Pharmaceut J* 131: 42-46

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17(1): 102 – 107, 2007.

PEREIRA NETO, Artur et al . Alternativas para o tratamento de efluentes da indústria galvânica. *Eng. Sanit. Ambient.*, Rio de Janeiro , v. 13, n. 3, Sept. 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522008000300004&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522008000300004>.

Práticas Integrativas e Complementares: Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. Ministério da Saúde, 2006.

Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ministério da Saúde, 2006.

QUEIROZ , Sonia CN; COLLINS, Carol H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001

RIBEIRO, Marcela Zanella et al . Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase poly(ethyleneglycol)/phosphate systems. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo , v. 38, n. 1, Mar. 2007 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000100016&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000100016>.

SANSON, Ananda Lima et al . Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. *Braz. J. Pharm. Sci.*, São Paulo , v. 47, n. 2, June 2011 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502011000200017&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502011000200017>

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., *Princípios de Análises Instrumental*. Bookman, 5ª Ed. São Paulo, 2002.

Southwell, I. ; Leach, D.; Lowe, R.; Pollack, A. Quality assurance for tea tree oil safety investigative samples. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australian Government, 2006.

Tsao, N.; Kuo, C. F.; Lei, H. Y.; Lu, S. L.; Huang, K. J. Inhibition of group A streptococcal infection by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil concentrate in the murine model. *Journal of Applied Microbiology*, 2009.

WALLENGREN, J. Tea tree attenuates experimental contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* (2011) 303:333 – 338.